

# イメージング質量分析を用いた生体内組織環境評価 技術の開発

著者	菰澤 崇
号	3
学位授与番号	42
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/37925">http://hdl.handle.net/10097/37925</a>

氏 名	にらさわ たかし
授 与 学 位	葦 澤 崇 博士 (学術)
学 位 記 番 号	学術 (環) 博第 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 環境科学専攻
学 位 論 文 題 目	イメージング質量分析を用いた生体内組織環境評価技術の開発
指 導 教 員	東北大学教授 田路 和幸
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 田路 和幸      東北大学教授 彼谷 邦光 東北大学教授 粕谷 厚生 (工学研究科) 東北大学助教授 バラチャンドラン ジャヤデワン

## 論 文 内 容 要 旨

### 第 1 章 緒論

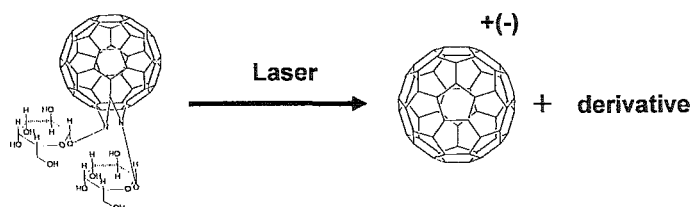
近年、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が広く行われているが、中でも、特に疾患をターゲットに研究を行う臨床プロテオーム解析が注目されている。正常および疾患検体から採取した血清、血漿等を簡易精製した後に質量分析を行い、得られた正常/疾患の複数のスペクトルパターンからバイオマーカーの探索を行う。そのバイオマーカーが生体組織内のどの部位に存在するかを二次元的に可視化し、モニタリングする方法として、イメージング質量分析が注目をあびるようになってきた。この手法は、テーラーメイド医療、診断および治療の実現に結びつく、非常に重要な研究領域であると考えられる。一方、ナノテクノロジーの進歩も生化学領域に及び、テーラーメイド医療に向けての研究が進められている。ドラッグデリバリーシステム(DDS)、磁性流体ハイパーサーミア、さらにナノトキシコロジー等がさかんに研究されており、これら各種異分野の融合が今後のプロテオミクス研究に必要不可欠であると考えられる。

ノーベル賞受賞で注目を受けた MALDI は、そのイオン化法にまだ不明な点も多く、その操作は経験則に頼った部分が多い。その大きな原因として、試料が固体結晶であり、毎回完全に均一な状態を作るのが困難であることが挙げられる。イメージング質量分析を用いることで MALDI の最適な試料調製方法の評価を行うことができれば、「評価技術」としてのイメージング質量分析に関する知見を得る以外にも、MALDI の特性について理解を深めることが可能であると考えられる。また、イメージング質量分析を行うためには非常に多くのスペクトルを得る必要があるため、自動測定が必要になる。イメージング質量分析のさらなる汎用化、一般化のためには、自動測定の規格化が望まれる。

本研究では臨床プロテオーム分野におけるイメージング質量分析の有用性に着眼し、それを用いた生体内組織環境評価技術の開発を第一の目的としている。イメージング質量分析は疾患に関与するマーカ

一がどの部位にどの程度存在するかなど、より具体的に疾患そのものの状態を判断できるという点で優れている手法であるが、これに関する研究はまだ新しく、限られた研究者によって研究室レベルでのみ、その装置開発や実際の臨床試料を使用した研究が行われており、そこには汎用性や共通の見解が欠けていた。イメージング質量分析は MALDI-TOF-MS を用いて行われているが、本研究では MALDI-TOF-MS による質量分析法について改めて理解し、汎用性等について改良するとともに、これを利用して、これまでのイメージング質量分析の問題点を克服できる新しい評価方法の開発を試みた。そして最終的には、このシステムを臨床医療の場に導入し、疾患の診断や早期発見に貢献できるような研究へとつなげていくことを目指している。

イメージング質量分析は生体組織内のタンパク質を直接測定・モニタリングする目的で使用されているが、質量分析では質量数が等しい、もしくは極めて近い物質を区別することができないという問題がある。本研究ではそれを解決するために、標的となる物質に選択的に標識を行い、その標識を観測する間接的モニタリングシステムを提案する。標識にはフラーレンを候補として考えているが、その理由はフラーレンが反応性に富む物質であり、特定の物質に選択的に標識できる分子をデザインしやすいこと、またフラーレン誘導体がマトリックスを用いない LDI によるイオン化で下図のように容易に解離して、官能基を含まないフラーレンのみが検出されるため間接的モニタリングに適していると予測されることなどが挙げられる。本研究ではまずフラーレンそのものの MALDI-TOF-MS における挙動・特性を明らかにし、さらに生体内環境を模した条件下における水溶化フラーレンによる間接的モニタリングシステムを確立し、今後の可能性についても議論を行う。



## 第2章 MALDI-TOF-MSによる試料評価に関する考察

イメージング質量分析を初めて試料調製の評価を行う目的で使用し、その評価ツールとしての有用性を確認した。試料調製時のマトリックスの結晶化の状態が、MALDIの測定結果に大きく影響することが明らかになり、イメージングの結果はデータベースサーチの結果ともよく一致したことから、プロテオミクス解析を行う場合、Affinity Preparation 法が、高感度かつ再現性の良い調製方法であることが実証された。この調製法では試料の高い均一性が期待できるため、精度の高いデータが取得でき、最適な結晶を探し出しながら測定を行う、MALDIに独特のいわゆるスポットハンティングの必要もなくなる。このことはハイスループットな測定の実現につながると考えられた。

自動測定では、ファジーコントロールを使用することで、ソフトウェアが自動的に適した測定条件を探し出し、試料の結晶状態の影響を受けにくい精度の高い測定が実現できた。濃度や物性の異なるさまざまな試料を自動的に測定する場合に特に有効である。また積算数については、試料の条件にかかわらず、300回以上必要であることがわかった。ただし積算数が多すぎると、レーザー照射の位置に重なりができ、その部分の試料自体が消失することによって、データの質を低下させることが見出された。オーバーラップせずに試料全体を網羅できるポジション移動や、試料ごとの最大許容積算数の把握が重要であることがわかった。

### 第3章 水溶化フラレーンおよび誘導体の評価方法の開発

MALDI-TOF/TOF-MSにより、フラレーン類の解離パターンに関する詳細な構造解析を行い、水溶化フラレーン誘導体の間接的な同定方法を確立した。フラレーン( $C_{60}$ )の特徴的な解離パターンとして、高分子領域では $C_{2n}$  ( $2n < 30$ )のニュートラルロスが起これ、 $C_x$  ( $x > 30$ )イオンが生成されることが確認された。また、低分子領域には $C_1$ ロスシリーズが観察され、 $C_2$ ロスシリーズが見られないことから、フラレーン骨格を持たない構造へと変化した可能性が見出された。それはグラファイトからクラスターを生成した実験と類似した結果を示しており、カゴ構造が開いたオープンケージクラスターからの解離であることが予想された。また、今回新しくチャージコントロールマトリックスを使用し、フラレーン類のような正負両方のイオンを生じるような試料も、高感度で選択的にイオン化できた。この特殊なマトリックスにより、今までMALDIではイオン化が困難であった物質のイオン化も期待できる。

糖付加水溶化フラレーンの実験からは、今までに得られた解離パターンの解析をもとに、確実に水溶化フラレーンが同定できた。この水溶化フラレーンを標識物質として使用し、 $T^3$ 法と呼ばれる新しい解離方法と組み合わせることで、イメージング質量分析における間接的モニタリングが想定でき、今後の研究への有用性が期待された。

### 第4章 イメージング質量分析を用いた生体組織評価技術の開発

第2章で得られたMALDI-TOF/TOF-MSの特性およびイメージング質量分析の評価方法としての有用性を活用し、また第3章で得られたフラレーン類の特徴的な解離の性質に基づく水溶化フラレーン同定方法を利用した、新しい評価方法の開発を目的とした。

この技術は、ナノテクノロジーの産物である水溶化フラレーンを使用し、そのフラレーン誘導体の「解離しやすい」性質を利用した、非常にユニークな検出システムである。また、ナノテクノロジーの分野で重要なクラスターのサイズ制御技術によって得られた、さまざまなサイズのフラレーンを使用することにより、マルチプレックスでの検出が可能であり、その実用化が期待される。さらに、マトリックス

フリーで検出可能である点においても、画期的な方法といえる。また、さまざまなバイオマーカーに選択的に結合するような官能基を導入することにより、標識としてのフラーレンに選択性を持たせることができ、その感度のさらなる向上も予想される。

本研究で提案・開発した「選択的標識を有する水溶化フラーレン誘導体を用いた間接的モニタリングシステム」は、現在のイメージング質量分析が抱えている問題点を克服できる新しい評価法である。このシステムは現存の技術だけで対応しうる、即戦力のある手法であり、そのさまざまな応用が考えられ、特に今後のナノ医療のさきがけとなる技術になることが期待できる。

## 第5章 結論

本研究では、現在注目されている臨床プロテオームという分野において、質量分析をいかに有用に役立てることができるかという観点から特にイメージング質量分析に着眼し、この測定法について改めて理解し、改良するとともに、これを利用した新しい評価方法、すなわち水溶化フラーレン誘導体を用いた間接的モニタリングシステムを開発した。その最終的な目的は、このシステムを臨床医療の場に導入し、がんをはじめとするさまざまな疾患の診断や早期発見に貢献できるような開発の第一歩とすることである。その研究過程において、まずはイメージング質量分析を用いてMALDIの最適な試料調製法や自動測定におけるファジーコントロールの有用性、さらには積算回数に至るまでの検討を行った。それによってイメージング質量分析の評価方法としての有効性が確認されたことはもとより、付随して得られたさまざまな知見はイメージング質量分析のみならず、PMFをはじめとする従来の測定に対しても非常に有用である。

また、フラーレンおよびフラーレン誘導体の解離について議論を行うと同時に新規マトリックスの開拓を行った。これによってイオン化のチャージをコントロールできるマトリックスが存在することが判明し、また同時に高感度化を達成できることもわかった。これらの新しいマトリックスがさらに応用され、またこれを機に新たなマトリックスの開発が進められることを期待する。

さらに、最終的な目的であるイメージング質量分析を用いた生体内環境評価技術として、水溶化フラーレンを使用した実験を行い、生体内環境を模した **Nitrocellulose Membrane** から、予め染み込ませておいた水溶化フラーレンを検出・同定することができた。同様に、組織切片を用いた実験においては、組織由来のピークが観測されず、フラーレンのみを検出することができ、マトリックスフリーであることの有用性が明らかになった。これによって現在のイメージング質量分析が抱える問題を解決できるとともに、より実際の臨床医療に対応できる応用開発が期待される。また、この研究により生化学におけるフラーレンの研究が活性化され、水溶化フラーレン誘導体による新たな標識が多く研究者によってデザインされ、応用されることを期待する。

# 論文審査結果の要旨

第1章は、緒論であり、以下のような研究背景が述べられている。

近年、ポストゲノム研究としてプロテオミクス解析が広く行われているが、中でも、特に疾患をターゲットに研究を行う臨床プロテオーム解析が注目されている。その手法として、イメージング質量分析が注目をあびるようになってきた。

本研究では臨床プロテオーム分野におけるイメージング質量分析の有用性に着眼し、それを用いた生体内組織環境評価技術の開発を第一の目的としている。

第2章は、MALDI-TOF-MSによる試料評価に関する考察を行っている。イメージング質量分析を初めて試料調製の評価を行う目的で使用し、その評価ツールとしての有用性を確認した。試料調製時のマトリックスの結晶化の状態が、MALDIの測定結果に大きく影響することが明らかになり、イメージングの結果はデータベースサーチの結果ともよく一致したことから、プロテオミクス解析を行う場合、Affinity Preparation法が、高感度かつ再現性の良い調製方法であることが実証された。この調製法では試料の高い均一性が期待できるため、精度の高いデータが取得でき、最適な結晶を探し出しながら測定を行う、MALDIに独特のいわゆるスポットハンティングの必要もなくなる。このことはハイスループットな測定の実現につながると考えられた。

第3章 水溶化フラレーンおよび誘導体の評価方法の開発を行っている。MALDI-TOF/TOF-MSにより、フラレーン類の解離パターンに関する詳細な構造解析を行い、水溶化フラレーン誘導体の間接的な同定方法を確立した。フラレーン( $C_{60}$ )の特徴的な解離パターンとして、高分子領域では $C_{2n}$  ( $2n < 30$ )のニュートラルロスが起こり、 $C_x$  ( $x > 30$ )イオンが生成されることが確認された。また、低分子領域には $C_1$ ロスシリーズが観察され、 $C_2$ ロスシリーズが見られないことから、フラレーン骨格を持たない構造へと変化した可能性が見出された。それはグラファイトからクラスターを生成した実験と類似した結果を示しており、カゴ構造が開いたオープンケージクラスターからの解離であることが予想された。また、今回新しくチャージコントロールマトリックスを使用し、フラレーン類のような正負両方のイオンを生じるような試料も、高感度で選択的にイオン化できた。この特殊なマトリックスにより、今までMALDIではイオン化が困難であった物質のイオン化も期待できる。

第4章 イメージング質量分析を用いた生体組織評価技術の開発を行っている。第2章で得られたMALDI-TOF/TOF-MSの特性およびイメージング質量分析の評価方法としての有用性を活用し、また第3章で得られたフラレーン類の特徴的な解離の性質に基づく水溶化フラレーン同定方法を利用した、新しい評価方法の開発を目的とした。この技術は、ナノテクノロジーの産物である水溶化フラレーンを使用し、そのフラレーン誘導体の「解離しやすい」性質を利用した、非常にユニークな検出システムである。また、ナノテクノロジーの分野で重要なクラスターのサイズ制御技術によって得られた、さまざまなサイズのフラレーンを使用することにより、マルチプレックスでの検出が可能であり、その実用化が期待される。さらに、マトリックスフリーで検出可能である点においても、画期的な方法といえる。また、さまざまなバイオマーカーに選択的に結合するような官能基を導入することにより、標識としてのフラレーンに選択性を持たせることができ、その感度のさらなる向上も予想される。

第5章は、結論である。

本研究は、現在注目されている臨床プロテオームという分野において、質量分析をいかに有用に役立てることができるかという観点から特にイメージング質量分析に着眼し、この測定法について改めて理解し、改良するとともに、これを利用した新しい評価方法、す

なわち水溶化フラーレン誘導体を用いた間接的モニタリングシステムを開発した。このように、本研究では、本システムを臨床医療の場に導入し、癌をはじめとするさまざまな疾患の環境診断や早期発見に貢献できるような技術開発の基礎技術を構築している。

よって、本論文は博士（学術）の学位論文として合格と認める。